



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

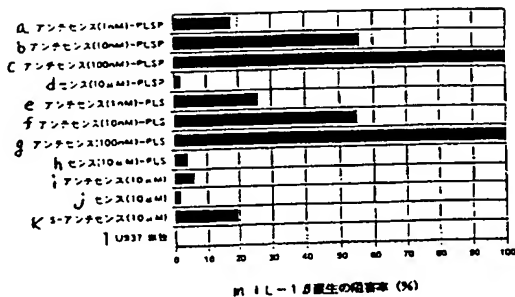
(51) 国際特許分類 A61K 38/14, 48/00, 31/70		A1	(11) 国際公開番号 WO97/10840
			(43) 国際公開日 1997年3月27日 (27.03.97)
(21) 国際出願番号 PCT/JP96/02682		(72) 発明者：および (75) 発明者／出願人（米国についてののみ） 佐藤秀次(SATO, Shuji)(JP/JP) 後藤 武(GOTO, Takeshi)(JP/JP) 和田 晃(WADA, Akira)(JP/JP) 鈴木要介(SUZUKI, Yousuke)(JP/JP) 〒305 茨城県つくば市観音台1丁目25番11号 久光製薬株式会社 筑波研究所内 Ibaraki, (JP) 川合眞一(KAWAI, Shinichi)(JP/JP) 〒145 東京都大田区田園調布3丁目3番3号 Tokyo, (JP) 水島 裕(MIZUSHIMA, Yutaka)(JP/JP) 〒157 東京都世田谷区梅ヶ丘1丁目1番11号 Tokyo, (JP)	
(22) 国際出願日 1996年9月18日 (18.09.96)		(74) 代理人 弁理士 西澤利夫(NISHIZAWA, Toshio) 〒150 東京都渋谷区宇田川町37-10 麻仁ビル6階 Tokyo, (JP)	
(30) 優先権データ 特願平7/238583 1995年9月18日 (18.09.95) 特願平7/278184 1995年10月25日 (25.10.95) 特願平8/149598 1996年6月11日 (11.06.96)		(81) 指定国 AU, CA, CN, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(71) 出願人（米国を除くすべての指定国について） 久光製薬株式会社 (HISAMITSU PHARMACEUTICAL CO., INC.)(JP/JP) 〒841 佐賀県鳥栖市田代大官町408番地 Saga, (JP) 株式会社 エルティーディー研究所 (LTT INSTITUTE, CO., LTD.)(JP/JP) 〒216 神奈川県川崎市宮前区蒼生2丁目16番1号 Kanagawa, (JP)		添付公開書類 国際調査報告書 請求の範囲の補正の期限前であり、補正書受領の際には再公開される。	

(54) Title: ANTI-INFLAMMATORY ANTISENSE DRUG

(54) 発明の名称 抗炎症性アンチセンス薬物

(57) Abstract

An anti-inflammatory antisense drug which comprises a complex of a synthetic polyamino acid consisting of repeated sequences of lysine and serine residues or polyethylene glycol modifications thereof and an antisense oligonucleotide complementary to the partial or whole base sequence of an mRNA encoding physiologically active substances participating in human inflammatory diseases such as interleukin-1 $\beta$ , tumor necrotizing factor or  $\alpha$ -cyclooxygenase. This drug enables efficacious treatment of inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis, parodontitis, nephritis, ulcerous colitis, arterial sclerosis and psoriasis, septic shock, Crohn's disease, AIDS, intractable hepatic diseases, pathologies in association with liver transplant, etc.



BEST AVAILABLE COPY

a ... antisense (1 nM)-PLSP  
b ... antisense (10 nM)-PLSP  
c ... antisense (100 nM)-PLSP  
d ... sense (10  $\mu$ M)-PLSP  
e ... antisense (1 nM)-PLS  
f ... antisense (10 nM)-PLS  
g ... antisense (100 nM)-PLS  
h ... sense (10  $\mu$ M)-PLS  
i ... antisense (10  $\mu$ M)  
j ... sense (10  $\mu$ M)  
k ... s-antisense (10  $\mu$ M)  
l ... U937 alone  
m ... IL-1 $\beta$  production inhibitory ratio (%)

(57) 要約

この発明は、リジン残基とセリン残基との繰り返し配列からなる合成ポリアミノ酸またはそのポリエチレングリコールブロック修飾体と、ヒト炎症性疾患に与するインターロイキン-1 $\beta$ 、腫瘍壊死因子、 $\alpha$ シクロオキシゲナーゼ等の生理活性物質をコードするmRNAの一部もしくは全塩基配列に相補的なアンチセンス・オリゴヌクレオチドとの複合体からなる抗炎症性アンチセンス薬物を提供する。この発明によって、慢性関節リウマチ、歯周囲炎、腎炎、潰瘍性大腸炎、動脈硬化症、乾癬などの炎症性疾患、敗血症性ショック、クローン病、エイズ、難治性肝疾患や肝移植における病態等に対する有効な治療が可能となる。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AL	アルバニア	EE	エストニア	LR	リベリア	RU	ロシア連邦
AM	アルメニア	ES	スペイン	LS	レソト	SD	スーダン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SE	スウェーデン
AU	オーストラリア	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SG	シンガポール
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LV	ラトヴィア	SI	スロヴェニア
BB	バルバドス	GB	イギリス	MC	モナコ	SK	スロヴァキア共和国
BE	ベルギー	GE	グルジア	MD	モルドバ	SN	セネガル
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MG	マダガスカル	SZ	スワジランド
BG	ブルガリア	GN	ギニア	MK	マケドニア	TD	チャード
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	UA	ウクライナ	TG	トーゴ
BR	ブラジル	HU	ハンガリー	ML	マリ	TJ	タジキスタン
BY	ベラルーシ	IE	アイルランド	MN	モンゴル	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	IS	アイスランド	MR	モリタニア	TR	トルコ
CF	中央アフリカ共和国	IT	イタリア	MW	マラウイ	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	JP	日本	MX	メキシコ	UA	ウクライナ
CH	スイス	KE	ケニア	NE	ニジェール	UG	ウガンダ
CI	コート・ジボアール	KG	キルギスタン	NL	オランダ	US	米国
CM	カメルーン	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NO	ノルウェー	UZ	ウズベキスタン共和国
CN	中国	KR	大韓民国	NZ	ニュージーランド	VN	ヴェトナム
CZ	チェコ共和国	KZ	カザフスタン	PL	ポーランド	YU	ユーゴスラビア
DE	ドイツ	LI	リヒテンシュタイン	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	LK	スリランカ	RO	ルーマニア		

## 明細書

## 抗炎症性アンチセンス薬物

## 技術分野

この発明は抗炎症性アンチセンス薬物に関するものである。さらに詳しくは、この発明は、慢性関節リウマチ、歯周囲炎、腎炎、潰瘍性大腸炎、動脈硬化症、乾癬などの炎症性疾患、敗血症性ショック、クローン病およびエイズなどの病態、難治性肝疾患や肝移植における病態に関与する生理活性物質の遺伝子発現を特異的にブロックするアンチセンス薬物に関するものである。

## 背景技術

従来より、染色体DNAの機能発現を制御する方法として、アンチセンス法が知られている。このアンチセンス法は、特定のタンパク質合成情報をコードしている染色体DNAから転写されるmRNA（センス鎖）と一部または全部にわたって相補的な塩基配列を持つDNAまたはRNA（アンチセンス鎖）を用い、センス鎖とアンチセンス鎖が互いの相補性により結合することを利用してmRNAからのタンパク質合成情報を遮断する方法である。なお、主として安定性の観点から、これまでの例ではセンス鎖との結合配列としてアンチセンスDNAが用いられることが多い。

現在、mRNAの機能を遮断するためには、その全配列に相補的なアンチセンス鎖は必要とはされず、mRNAからのタンパク質発現を制御する一部配列をターゲティング部位とすることが有効であると考えられている。すなわち、このようなターゲティング部位としては、①スプライシング部位、②キャッピング部位、③AUGイニシエーションコドン(initiation codon)部位近傍が選択されることが多く、特にAUGイニシエーションコドン部位については比較的高いアンチセンス効果が得られている。mRNAの立体構造も考慮すべきで、一般にはループ構造、あるいはバルジ構造といった一本鎖領域にアンチセンスDNAは結合しやすいと考えられている。

ところで、天然物を起源とする医薬品の歴史は、科学の進歩とともに急激な変換を遂げてきており、新世紀に向けて創薬の潮流の一つは確実に遺伝子を対象としたものへと流れ出ている。ヒト遺伝子の全塩基配列を解明することを目的とした「ヒトゲノムプロジェクト」の進行いかんでは、全てのヒト遺伝子を含む完全なゲノム配列が2010年頃には決定されると言われている。この膨大な情報は、遺伝子の欠損あるいは異常発現が関与すると考えられる疾患の解析研究に拍車をかけ、治療の概念を塗り替えることになると考えられている。こうした研究の機運を背景に、遺伝子療法やアンチセンス療法が新世紀の療法として脚光をあびるようになってきている (Cook, S. T., Ann. Rev. Pharm. 32, 329-376, 1992; Tidd, D. M., Anticancer Res. 10, 1169-1182, 1990)。

遺伝子治療はバイオエシックス等の問題により、その適応は単一遺伝子病や癌、AIDSなどに限られている。これに対して、アンチセンスDNAはあくまでも従来の合成医薬品と同様の化合物として捕らえることができ、しかもin vitroのみならず in vivoでの効果も報告されるようになり、その可能性の探索は新しい研究段階に入ってきている。

アンチセンスDNAの医薬品としての可能性が提案されたのは、合成アンチセンスDNAを外から加え、ラウス肉腫ウイルスの形質転換を抑制したという1978年の報告が先駆けである (Zamecnik P. C. and Stephenson M. L., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 75, 280-284, 1978)。ポリアニオンであるDNAが細胞内に取り込まれることが疑問視されていたが、その後、アンチセンスDNAが内在性遺伝子の働きを遮断したことが培養細胞系で次々と報告され、医薬品としての期待が高まってきた。しかし、自然界に存在するホスホジエステル型DNA (以下、D-オリゴと略記する) は、ヌクレアーゼなどにより短時間で分解されてしまうという医薬品としては致命的な欠点をもっている。このため、生物学的安定性をあげるためにDNAを化学修飾することが試みられているが、なかでもホスホロチオエート型のヌクレオチド (以下、S-オリゴと略記する) が安定で高い生物活性を得ている。現在、臨床試験に入っているものはこのタイプである。

医薬品としてのアンチセンスDNAの条件は、①mRNAに対して塩基配列特異性をもつこと、②安定に細胞内へ輸送されること、③mRNAのターゲティン

グ部位に接近でき、④安定な二重鎖を形成できること、⑤一定時間細胞内で安定に存在できること、⑥毒性、副作用がないこと、⑦ある程度代謝されること、⑧経済的であること、などがあげられる。なかでも安定な形で細胞内へ輸送されることが必須条件となる。DNAまたはRNAは、ヌクレアーゼ（以下、各々DNase およびRNase と略記する）などにより定量的に分解されてしまい、血中半減期は1分以内ときわめて短い。安定化のために、特に、リン酸基の酸素原子の1つをS-に置換したS-オリゴやCH<sub>3</sub>基に置換したメチルフォスフォネートが主流となっている。他には、糖部分の修飾や3'と5'末端の修飾、2'位の修飾体も考えられている（Goodchild, J. Bioconjug Chem. 1, 165-187, 1990）。また、最近ではリン酸結合をペプチド結合に変えたPeptide Nucleic Acid（PNA）が合成されており、アンチセンスDNAよりもDNAやRNAに対する結合が強く、ヌクレアーゼに対して耐性であったと報告されているが（Hanvey, L. et al., Science 258, 1481-1485 (1992)）、生物活性の報告はまだ存在しない。3'末端に塩基対を形成しループ構造を形成するようにデザインされたものや、ダンベル型のものや閉環構造のものも安定であると報告されている。

しかしながら、これら修飾体は、それらの合成に關与するコストを始め、さらにはそれらの精製が非常に困難であるなどの問題が多く、医薬品への応用は考えにくいのが現状である。また、これまでの研究では、上記のとおりS-オリゴが盛んに用いられているが、この型のオリゴヌクレオチドはセンス鎖への結合特異性(binding specificity)が低いことも大きな問題としてあげられる。このような意味から、アンチセンスDNAを医薬へ応用する場合には、必然的にD-オリゴが最も適したものであると考えられている。

さらにまた、当初からDNA等の核酸の低い膜透過性は問題視されており、上記のホスホジエチル型オリゴヌクレオチドの細胞内安定性の問題も考慮すると、今後のアンチセンス医薬品としての鍵は細胞内導入法（デリバリー法）にあるといっても過言ではない。培養系での成功例からも分かるように、DNA等のオリゴヌクレオチドが細胞内に取り込まれることは間違いなく、主としてエンドサイトーシスで取り込まれ、約80 kDaの膜タンパク質が推定レセプターとして考えられている。修飾オリゴヌクレオチドも主としてエンドサイトーシスにより取

り込まれるが詳細は不明な点が多く、依然として細胞内への移行量は少ない。低い膜透過性を増強させるためのデリバリー法が考案されているが、毒性などの問題も含めて解決すべき点が残っている。

一方、炎症性疾患の治療には、近年、ステロイド剤および非ステロイド系抗炎症剤が多く使用されている。ステロイド剤は各種の炎症性疾患における諸症状を顕著に改善するが、投与するにつれて次第にその効果が減少すること、副作用として冠動脈不全、消化性潰瘍、白内障、敗血症、易感染症などを誘発する危険があるなどの問題点を有している。また、非ステロイド系抗炎症剤は一時的に炎症症状を抑制するが、炎症性疾患を根本から治療するものではない。従って、効力が強く、その治療効果が持続的でかつ安全性の高い炎症性疾患治療剤の開発が望まれているのが現状である。

特に、慢性関節リウマチは、関節滑膜を病変の主座とする原因不明の慢性炎症性疾患である。病変部位は、時に関節滑膜に止まらず、関節滑膜に初発した炎症は、やがて軟骨、骨の破壊を引き起こし、ついには全身の関節組織破壊へと至る。従来の慢性関節リウマチの治療には経験的な要素が強く作用し、その第一選択薬としては非ステロイド系消炎鎮痛薬が用いられてきた。しかし、最近では、慢性関節リウマチの治療における非ステロイド系消炎鎮痛薬の役割は縮小しつつある。その投与によって鎮痛作用は期待できるものの、非ステロイド系消炎鎮痛薬には抗リウマチ作用がないということが共通認識となっており、しかも、消化管障害、腎機能低下などに代表される非ステロイド系消炎鎮痛薬の副作用が、臨床上、無視できないことが明らかになってきたためである。

このような状況の中で、メトトレキサートをはじめとして、ミゾリビン、FK 506等の新たな抗リウマチ薬の早期使用が行われつつある。

なお、慢性関節リウマチをはじめとする各種炎症性疾患については以下のメカニズム等が知られている。すなわち、炎症は起炎物質の侵襲に対する恒常性維持のための生体反応である。炎症反応には様々な細胞が動員されるが、サイトカインはこれら細胞間のメディエーターの一つであり、炎症反応において重要な役割を担っている。様々なサイトカインが炎症部位で産生され、サイトカインカスケードを形成しながら炎症巣ならびに全身における炎症反応を調節している。これ

らのサイトカインのうち、腫瘍壊死因子 (Tumor Necrosis Factor: 以下、TNF と略記する) はマクロファージ等の細胞が産生するサイトカインである。この TNF は当初は腫瘍に障害を与える物質として見出されたが、最近では広く炎症を通じた生体防御反応の係わるサイトカインとして理解されつつある。TNF の遺伝子は、ヒト、ブタ、ウシ、ウサギ、マウス等の広範な哺乳動物でその存在が明らかになっており、それらの 1 次構造も決定されている。それによると、各動物間でのアミノ酸配列は、80% 前後の相同性が保存されており、TNF が生体にとって極めて重要な生理活性物質であることを示唆している。ヒト TNF 前駆体は、233 個のアミノ酸残基をもち、成熟型では 155 個または 157 個のアミノ酸から構成されている。分子量は 17kDa であるが、生体内では 45kDa の 3 量体を形成している。マウスの TNF には糖鎖が存在すると考えられているが、ヒトには存在せず、またマウスの TNF においても糖鎖はその活性発現に必須ではない。

TNF は、BCG の感作された動物に、リポ多糖 (Lipopolysaccharide: 以下、LPS と略記する) を接種することにより発現する。実験的には、種々の方法でマクロファージの TNF 産生準備状態を作りだすことができ、適当な誘因刺激 (例えば、菌体や LPS 等の菌体成分) により、2 時間前後をピークとする TNF の産生を導くことができる。また、ヒトマクロファージ系細胞 (例えば、U937 株等) を用いた *in vitro* 実験系においても TNF の産生を再現することができる。

TNF が作用する細胞は多岐にわたる。例えば、マクロファージから産生された TNF は、好中球や血管内皮細胞に働き、炎症の初発からの進展をもたらす。その後、線維芽細胞や肝細胞に作用することによりその炎症は終息、修復へ向かうことになる。炎症反応は、多くの細胞とメディエーターが相互に関連しつつ進行し、通常は一定の速度で消失するが、抗原となるべき物質が存在し、その量が一定以上であれば、その情報は次には免疫系へと受け渡される。TNF は、このように非特異的生体防御反応から特異的防御反応への移行にも関与している。これら以外にも、TNF は例えば骨芽細胞、破骨細胞、脂肪細胞、上皮細胞、下垂体、そして特に滑膜細胞にも作用することが知られている。

また、慢性関節リウマチ等の炎症性疾患の病因としては、多彩な免疫応答系 - 炎症反応の異常が挙げられており、例えば、TNF の一つである TNF- $\alpha$  以外

にも、c-fos 等の癌遺伝子、ヒトインターロイキン-1 $\beta$ （以下、IL-1 $\beta$ と略記する）やIL-6等のサイトカインが関与していると考えられてもいる。そしてさらに、近年では、炎症性疾患のメディエーターの一つとしてプロスタグランジン（以下、PGと略記する）とその合成酵素の役割が注目されている。すなわち、1971年にVane等によってアスピリン等の非ステロイド系消炎鎮痛薬の作用機序がPG合成抑制にあることが報告されて以来、非ステロイド系消炎鎮痛薬の研究はPG合成抑制との関係で進められてきた。しかしながら、近年になって、PGを生合成する酵素シクロオキシゲナーゼ（以下、COXと略記する）には2種類のものがあり、これまで検討されてきたCOXは主として、生理的にすでに存在しているCOX-1と呼ばれる酵素であり、これとは別に、種々の刺激やサイトカイン等によって遊離細胞などで生産され、炎症や組織障害に大きく関係するCOX-2が存在することが見いだされた（Vane, J., *Nature*, 367, 215-216, 1994; Xie, W., Robertson, D., and Simmons, D., *Drug Devel. Res.*, 25, 249-265, 1992）。このCOX-2は、その遺伝子もCOX-1とは異なり、IL-1の刺激などにより新たに産生される酵素である。例えば、Lee等の報告によれば、マクロファージ中のCOX-1はLPSの刺激によっても不変であり、刺激や炎症にかかわらず一定の濃度で検出されるが、COX-2は正常状態ではその遺伝子もほとんど証明されず、LPSの刺激により増加し、しかもデキサメタゾンによりその発現が完全に抑制される。近年、ヒトCOX-2のcDNAがクローン化され、これによって炎症性細胞におけるCOX-2の産生の規則性が解明されつつある。

最近の分子生物学、免疫学等の進歩によって、慢性関節リウマチをはじめとする各種炎症性疾患の病因、病態の解析が上記のとおり急速に進展しつつあり、これらの知見に基づいた抗サイトカイン療法、抗接着分子療法、モノクローナル抗体療法、経口ペプチド療法、T細胞ワクチネーションなど、より理論的な裏打ちのある新たな治療法が開発されつつある。

一方、アンチセンス法が対象とするヒト疾患としては、その原因とターゲット遺伝子との関係が明瞭であるということから、ウイルス疾患がその筆頭に挙げられており、初期のアンチセンス療法は、サイトメガロウイルス、ヘルペスウイル



ス、ヒト免疫不全ウイルス、パピローマウイルス、水泡性口内炎ウイルス（VSV）等による感染症に対して効果を上げている。また、慢性骨髄性白血病の原因である転座した bcr-abl 遺伝子や、あるいは炎症または癌転移に影響している接着分子の一つである ICAM-1 を対象としたアンチセンス療法も効果を上げている。

しかしながら、一般的には、疾患の原因となる遺伝子が複数あるよりは、アンチセンス法の特性上、病因と遺伝子が 1 : 1 で対応するときに最大の効果が期待できる。従って、炎症性疾患の治療にアンチセンス法を応用するためには、病態的確な把握とともに、原因遺伝子の同定が不可欠である。そして、さらにはその遺伝子の発現メカニズムを特定し、発現遮断のための適切な部位を選択することも必要である。

#### 発明の開示

この発明は、以上のとおりの事情に鑑みてなされたものであり、慢性関節リウマチ、歯周囲炎、腎炎、潰瘍性大腸炎、動脈硬化症、乾癬などの炎症性疾患、敗血症性ショック、クローン病、エイズなどに関与する生理活性物質の発現を特異的にブロックするアンチセンス DNA を主成分とする新しい抗炎症性薬物を提供することを目的としている。

この発明は、上記の課題を解決するための第 1 の発明として、合成ポリアミノ酸またはその誘導体と、ヒト炎症性疾患に関与する生理活性物質をコードする mRNA の一部もしくは全塩基配列に相補的なアンチセンス・オリゴヌクレオチドとの複合体からなることを特徴とする抗炎症性アンチセンス薬物を提供する。

この第 1 の発明の抗炎症性アンチセンス薬物においては、上記の合成ポリアミノ酸が、リジン残基とセリン残基との繰り返し配列からなる核酸結合体であること、またその誘導体が、合成ポリアミノ酸のポリエチレングリコール（以下、PEG と略記する）ブロック修飾体であることを好ましい態様としている。

またこの発明は、第 2 の発明として、合成ポリアミノ酸またはその誘導体と、ヒト IL-1 $\beta$  をコードする mRNA の一部もしくは全塩基配列に相補的なアンチセンス・オリゴヌクレオチドとの複合体からなることを特徴とする抗炎症性ア

ンチセンス薬物を提供する。この第2の発明においては、上記のIL-1 $\beta$ をコードするmRNAの一部もしくは全塩基配列に相補的なアンチセンス・オリゴヌクレオチドが、配列番号2または4の一部もしくは全塩基配列を有するオリゴヌクレオチドであることを好ましい態様としている。

さらに第3の発明として、合成ポリアミノ酸またはその誘導体と、ヒトTNFをコードするmRNAの一部もしくは全塩基配列に相補的なアンチセンス・オリゴヌクレオチドとの複合体からなることを特徴とする抗炎症性アンチセンス薬物を提供する。この第3の発明においては、ヒトTNFが、ヒトTNF- $\alpha$ であり、このヒトTNF- $\alpha$ をコードするmRNAの一部もしくは全塩基配列に相補的なアンチセンス・オリゴヌクレオチドが、配列番号6、配列番号8または配列番号10のいずれかの一部もしくは全塩基配列を有するオリゴヌクレオチドであることを好ましい態様としている。

さらにまた、第4の発明として、合成ポリアミノ酸またはその誘導体と、一連のPGE<sub>2</sub>合成酵素をコードするmRNAの一部もしくは全塩基配列に相補的なアンチセンス・オリゴヌクレオチドとの複合体からなることを特徴とする抗炎症性アンチセンス薬物を提供する。この第4の発明においては、PGE<sub>2</sub>合成酵素が、COX-2であり、このCOX-2をコードするmRNAの一部もしくは全塩基配列に相補的なアンチセンス・オリゴヌクレオチドが、配列番号12の一部もしくは全塩基配列を有するオリゴヌクレオチドであることを好ましい態様としている。

#### 図面の簡単な説明

図1は、この発明に用いることができるPLSの化学式(a)およびPLSPの化学式(b)である。

図2は、配列番号2のDNA鎖を用いた抗炎症性アンチセンス薬物および比較例によるIL-1 $\beta$ の産生抑制効果を示すグラフ図である。

図3は、配列番号4のDNA鎖を用いた抗炎症性アンチセンス薬物および比較例によるIL-1 $\beta$ の産生抑制効果を示すグラフ図である。

図4は、配列番号2のDNA鎖を用いた抗炎症性アンチセンス薬物および比較

例による  $IL-1\beta$  の産生抑制効果を示すグラフ図である。

図 5 は、配列番号 6 の DNA 鎖を用いた抗炎症性アンチセンス薬物および比較例による  $TNF-\alpha$  の産生抑制効果を示すグラフ図である。

図 6 は、配列番号 8 または 10 の DNA 鎖を用いた抗炎症性アンチセンス薬物および比較例による  $TNF-\alpha$  の産生抑制効果を示すグラフ図である。

図 7 は、配列番号 6 の DNA 鎖を用いた抗炎症性アンチセンス薬物および比較例による  $TNF-\alpha$  の産生抑制効果を示すグラフ図である。

図 8 は、配列番号 11 または 12 の DNA 鎖を用いた抗炎症性アンチセンス薬物および対照による  $PGE_2$  の産生量を示すグラフ図である。

図 9 は、配列番号 11 または 12 の DNA 鎖を用いた抗炎症性アンチセンス薬物の U937 細胞への取り込み量を示すグラフ図である。

図 10 は、配列番号 11 または 12 の DNA 鎖を用いた抗炎症性アンチセンス薬物の滑膜細胞への取り込み量を示すグラフ図である。

図 11 は、配列番号 2 の DNA 鎖を用いた抗炎症性アンチセンス薬物および比較例によるエンドトキシン誘発ショックモデルに対する致死抑制効果と投与量の関係を示すグラフ図である。

図 12 は、配列番号 2 の DNA 鎖を用いた抗炎症性アンチセンス薬物によるエンドトキシン誘発ショックモデルに対する致死抑制効果と用法の関係を示すグラフ図である。

図 13 は、配列番号 2 の DNA 鎖を用いた抗炎症性アンチセンス薬物によるエンドトキシン誘発ショックモデルに対する致死抑制効果と投与経路の関係を示すグラフ図である。

図 14 は、配列番号 2 および配列番号 6 の各々の DNA 鎖を用いた抗炎症性アンチセンス薬物によるエンドトキシン誘発ショックモデルに対する致死抑制効果の差を示したグラフ図である。

#### 発明を実施するための最良の形態

合成ポリアミノ酸の核酸合成体は、水溶性アミノ酸セリン残基とカチオン性アミノ酸リジン残基の不規則もしくは規則的な繰返しにより構成される。セリン

残基とリジン残基の構成モル比は約 1 : 1 であり、その分子量は 3000 - 50000 程度である。このようなポリアミノ酸は、たとえばオリゴヌクレオチドと均一系で複合体を構成するポリーリジン：セリン（以下、P L S と略記する：特許 W O 9 5 / 0 9 0 0 9 号）を用いることができる。また、合成ポリアミノ酸の誘導体としては、特に、上記 P L S の P E G ブロック修飾体（以下、P L S P と略記する）を新規なものとして例示することができ、この P L S P は、例えば下記実施例 1 の方法によって作成することができる。なお、P L S および P L S P の構造は、例えば図 1 ( a ) ( b ) の化学式としてそれぞれ例示することができる。

さらに、炎症性疾患に関与する生理活性物質をコードする m R N A に相補的なアンチセンス・オリゴヌクレオチド、または P L S 等の合成ポリアミノ酸もしくはその誘導体（例えば、P L S P）による修飾体オリゴヌクレオチドは公知の方法（Rajendra, B. R. et al., Human Genetics, 55, 3633, 1980、Lim, F. and Sun, A., M., Science, 210, 908, 1980）によって調製することもできる。

### 実施例

以下、実施例を示し、この発明をさらに具体的に説明するが、この発明は以下の例に限定されるものではない。なお、以下の実施例および比較例において使用するオリゴヌクレオチドは、次のとおりに合成、生成した。

#### <オリゴヌクレオチドの合成および精製>

配列表の配列番号 1 から配列番号 1 5 のオリゴヌクレオチドを、DNA 合成機（アプライドバイオシステム社製タイプ 380B）を用いて合成した。2' - 水酸基の保護基に t - ブチルジメチルシリル基を用いたホスホロアミダイト法（Nucleic Acid Res., vol.17, 7059-7071, 1989）に基づき合成し、オリゴヌクレオチドの精製は文献（Nucleic Acid Res., vol.19, 5125-5130, 1991）に記載された方法に従って行った。

配列番号 1 は、既知の 2 0 塩基からなるオリゴヌクレオチドであり、慢性関節リウマチの生理活性物質の 1 つである I L - 1  $\beta$  遺伝子のイニシエーションコドンを含む 2 0 塩基に対応するセンス DNA 鎖であり、配列番号 2 は、これに相補

的なアンチセンスDNA鎖である。また、配列番号3は、同じIL-1 $\beta$ 遺伝子の非翻訳領域を含む20塩基に対応するセンスDNA鎖であり、配列番号4は、これに相補的なアンチセンスDNA鎖である（特開平6-41185号公報）。

また、配列番号5は、同じく慢性関節リウマチの生理活性物質の1つであるTNF- $\alpha$ 遺伝子のイニシエーションコドンを含む20塩基に対応するセンスDNA鎖であり、配列番号6は、これに相補的なアンチセンスDNA鎖、配列番号7は、TNF- $\alpha$ 遺伝子のスプライシングサイトを含む20塩基（TNF- $\alpha$ 遺伝子配列の1624-1643番目）に対応するセンスDNA鎖であり、配列番号8は、これに相補的なアンチセンスDNA鎖、配列番号9は、TNF- $\alpha$ 遺伝子のスプライシングサイトを含む20塩基（TNF- $\alpha$ 遺伝子配列の2161-2180番目）に対応するセンスDNA鎖であり、配列番号10は、これに相補的なアンチセンスDNA鎖である。

さらに、配列番号11は、ヒト慢性関節リウマチ等の炎症の免疫機構に関与するCOX-2のイニシエーションコドンを含む20塩基の領域に対応するセンスDNA鎖であり、配列番号12は、これに相補的なアンチセンスDNA鎖である。

さらにまた、配列番号13は、マウスのIL-1 $\beta$ 遺伝子のイニシエーションコドンを含む20塩基に対応するセンス鎖であり、配列番号14は、これに相補的なアンチセンスDNA鎖である。また、配列番号15は、マウスのTNF- $\alpha$ 遺伝子のイニシエーションコドンを含む20塩基に対応するアンチセンス鎖である。

#### 実施例1

##### <PEG修飾したPLSの合成および精製>

$\epsilon$ -カルボベンゾキシリジン-N-カルボン酸無水物1.0g（シグマ社製）およびベンジルセリン-N-カルボン酸無水物1.0g（シグマ社製）をN,N-ジメチルホルムアミド（DMF：和光純薬工業社製）の30mlに溶かし、クロロホルム（和光純薬工業社製）15mlを加えた。片末端メトキシ片末端アミノ基のポリエチレンオキシド（分子量5000：日本油脂社製）4.0gをクロロホルム15mlに溶かして、その溶液を $\epsilon$ -カルボベンゾキシリジン-N-カルボ

ン酸無水物およびベンジルセリン-N-カルボン酸無水物溶液に加えた。26時間後に、反応混合液を330mlのジエチルエーテルに滴下して沈殿したポリマーをろ過で回収してジエチルエーテル（和光純薬社製）で洗浄した後に真空中で乾燥し、臭化水素酢酸溶液（和光純薬工業社製）で脱保護を行いポリ-リジン：セリンのPEGブロックコポリマー（PLSP）を得た。

## 実施例2

### < IL-1 $\beta$ に対するアンチセンス薬物の作成 >

ポリ-リジン：セリンのコポリマー（PLS：シグマ社製）または実施例1で合成／精製したPLSPと、アンチセンス・オリゴヌクレオチド（配列番号2および4）のいずれか一方とを公知の方法によりイオン性複合体形成した。

すなわち、形成された複合体が透過しない膜分画能をもつ限外濾過用チューブ（日本ミリポア・リミテッド社製：ウルトラフリーC3-GC UFC3 TGC 00 フィルター付き遠心チューブ）に、アンチセンス・オリゴヌクレオチドとPLSまたはPLSPとの混合溶液を入れて遠心分離した。なお、オリゴヌクレオチドの濃度は1nM、10nMおよび100nMとなるように添加した。また、配列番号4のオリゴヌクレオチドは、10 $\mu$ M濃度のものも調製した。以上の条件により、遊離したオリゴヌクレオチドを下層へ濾過し、PLSとアンチセンス・オリゴヌクレオチド複合体（以下、アンチセンス-PLSと略記する）およびPLSPとアンチセンス・オリゴヌクレオチド複合体（以下、アンチセンス-PLSPと略記する）を得た。

また、これらの複合体の形成による濁りもしくは沈殿物生成の検討は、その溶液の360nmにおける吸光度測定により分光学的に行った。実験に際して、複合体は主としてイオン強度0.02のリン酸緩衝液（pH=7.2）で溶解した。その結果、今回用いたアンチセンス・オリゴヌクレオチドとPLSもしくはPLSPとの複合体形成に際しては、溶液系に白濁は一切見られなかった。

オリゴヌクレオチドの濃度は260nmの吸光度から求めた。その結果、形成された複合体におけるオリゴヌクレオチドが上記の各濃度であることが確認された。また、イオン性複合体形成における各々の電荷的中和の濃度は、PLSまた

はPLSPとオリゴヌクレオチドの分子量から求まる電荷の個数より計算した。

さらに、アンチセンス-PLSおよびアンチセンス-PLSPの各複合体が無電荷であることをキャピラリー電気泳動（マルチチャンネルキャピラリー電気泳動装置：CAPI-3000、MCPD-3600 SPECTRO MULTI CHANNEL DETECTOR 装備、大塚電子社製）により確認した。その結果、複合体のピークは無電荷のフェニルアラニンのピークと同じであった。

### 実施例 3

#### <培養細胞に対する抗炎症性アンチセンス薬物の効果>

実施例2で作成したアンチセンス-PLSおよびアンチセンス-PLSP複合体のIL-1 $\beta$ 産生抑制効果を培養細胞系において検討した。

細胞にはヒトマクロファージ系のU937細胞（大日本製薬社製）を用いた。細胞培養は、10%のFCS（Fetal Calf Serum：三光純薬社製）と100 unit/mlのペニシリン（ライフ・テクノロジー社製）および100  $\mu$ g/mlのストレプトマイシン（ライフ・テクノロジー社製）を含むRPMI培地（日研生物医学研究所製）を使って、37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>の条件下で行った。培養したU937細胞の数はトリパンブルーによる染色後、視覚的にカウントし求めた。

測定に際しては、 $3 \times 10^5$  個/mlに調製したU937細胞を含む0.15 mlの培地を96穴のマイクロプレートに添加した。これらの細胞に対して1 ng/mlの12-o-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate（TPA：和光純薬工業社製）および1  $\mu$ g/mlのLPS（シグマ社製）を添加した後、実施例2で作成したアンチセンス-PLSまたはアンチセンス-PLSPを添加した。また、対照として、センスDNA鎖（配列番号1および3）とPLSまたはPLSPとの複合体（各々、センス-PLSおよびセンス-PLSP）、アンチセンスDNA鎖単独およびセンスDNA鎖単独もそれぞれ添加した。

24時間のインキュベーション後、-70 $^{\circ}$ Cにて十分に冷凍し、その後に溶解凍結を3回繰り返す、上清の250  $\mu$ lを静かに集めた。これらはエライザ（ELISA）キット（IL-1 $\beta$  ELISA System：アマシャム社製）により調製した後、マイクロプレートリーダー（バイオ・ラッド社製）でデータ解析を行った。

その結果、この発明の抗炎症性アンチセンス薬物、特に IL-1 $\beta$  遺伝子のイニシエーションコドンに対するアンチセンス DNA（配列番号 2）と PLS または PLS P との複合体は、図 2 に示したとおり、ナノモル（nM）オーダで IL-1 $\beta$  の産生を 100% 抑制した。すなわち、アンチセンス DNA 濃度が 100 nM では 100% の IL-1 $\beta$  産生が抑制、10 nM 濃度では 50% の IL-1 $\beta$  産生が抑制、1 nM 濃度では 20% の IL-1 $\beta$  産生が抑制された。

一方、非翻訳領域に対するアンチセンス DNA（配列番号 4）の場合には、キャリアー特異的な効果が観られ、PLS P との複合体のみ nM オーダーで IL-1 $\beta$  の産生抑制効果が観察された。すなわち、図 3 に示したとおり、アンチセンス-PLS P の場合には、アンチセンス DNA 濃度が 10  $\mu$ M で 90% 以上、100 nM では 80% 以上の IL-1 $\beta$  産生が抑制され、10 nM 濃度では 30%、1 nM 濃度では 20% 弱の IL-1 $\beta$  産生が抑制された。これに対して、アンチセンス-PLS の場合には、10  $\mu$ M 濃度で 50% 弱、100 nM 以下の濃度では約 10% 弱の IL-1 $\beta$  産生抑制が観察されるに止まった。

なお、注目すべきこととして、同じ低濃度範囲内でアンチセンス鎖とセンス鎖において結合特異性が顕著に現われた。

#### 比較例 1

実施例 3 と同一の方法により、ホスホロチオエート型のアンチセンス・ヌクレオチド（以下、S-アンチセンスと略記する）の IL-1 $\beta$  産生抑制効果を測定した。結果は図 2 および図 3 に示したとおりである。この S-アンチセンスは同じ評価系で安定で高い生物活性を得ることができるといわれているが、IL-1 $\beta$  遺伝子のイニシエーションコドンに対する S-アンチセンス（配列番号 2）は、図 2 に示したとおり、10  $\mu$ M 濃度で約 20% の IL-1 $\beta$  産生抑制効果を示すのみであった。また、非翻訳領域に対する S-アンチセンス（配列番号 4）の場合には、図 3 に示したように、10  $\mu$ M 濃度で約 40% 程度の IL-1 $\beta$  産生抑制を示した。

#### 比較例 2



実施例 3 と同一の方法で、アンチセンス DNA（配列番号 2）とリポフェクチン（ギブコ社製）との複合体（以下、アンチセンスーリポフェクチンと略記する）の IL-1 $\beta$  産生抑制効果を測定した。結果は図 4 に示したとおりである。このリポフェクチンは、従来よりオリゴヌクレオチド用キャリアーとして高く評価されてきているが、アンチセンスーリポフェクチンは、かなり高いアンチセンス濃度（50  $\mu$ M）であるにもかかわらず、IL-1 $\beta$  産生抑制効果は 20% 程度であった。また、negative control として用いたセンス DNA（配列番号 1）とリポフェクチンとの複合体（以下、センスーリポフェクチンと略記する）と比較しても抑制効果に違いはみられず、オリゴヌクレオチドの結合特異性に差は見られなかった。

#### 実施例 4

##### < TNF- $\alpha$ に対するアンチセンス薬物の作成 >

配列番号 6、8 および 10 のアンチセンス・オリゴヌクレオチドを用いたことを除き、実施例 2 と同様の方法で TNF- $\alpha$  に対するアンチセンス薬物（アンチセンスーPLSP およびアンチセンスーPLS）を作成した。

これらのアンチセンス薬物について、実施例 2 と同様に濁りおよび沈殿物形成、オリゴヌクレオチド濃度、その電荷等を測定した。

#### 実施例 5

##### < 培養細胞に対する抗炎症性アンチセンス薬物の効果 >

実施例 4 で作成したアンチセンスーPLS およびアンチセンスーPLSP 複合体の TNF- $\alpha$  産生抑制効果を実施例 3 と同様の方法を用いて検討した。

ただし、対照としては、センス DNA 鎖（配列番号 5）と PLS または PLS P との複合体（各々、センスーPLS およびセンスーPLSP）、アンチセンス DNA 鎖単独およびセンス DNA 鎖単独をそれぞれ用いた。また、効果測定のエライザキットは、TNF- $\alpha$  ELISA System（フナコシ社製）を用いた。

その結果、TNF- $\alpha$  遺伝子のイニシエーションコドンに対するアンチセンス DNA（配列番号 6）と PLS P との複合体は、図 5 に示したとおり、アンチセ

ンスDNAの濃度が100 pMの場合にはTNF- $\alpha$ の産生を80%抑制し、10 pMの濃度では60%抑制したが、それ以下の濃度ではTNF- $\alpha$ の産生抑制は観察されなかった。また、注目すべきこととして、同じ低濃度範囲内でアンチセンス鎖とセンス鎖において顕著な結合特異性も観察された。なお、アンチセンス・オリゴヌクレオチドと複合体を形成する合成ポリアミノ酸としては、PLSよりもPLSPの方が高いTNF- $\alpha$ 産生抑制効果を示した。

一方、TNF- $\alpha$ 遺伝子のスプライシングサイトに対するアンチセンスDNA（配列番号8、10）とPLSPとの複合体によるTNF- $\alpha$ 産生抑制効果は、図6に示したとおり、イニシエーションコドンに対するアンチセンスDNA（配列番号6）とPLSPとの複合体とはほぼ同等であった。このスプライシングサイトに対するアンチセンス効果は、細胞の核内へオリゴヌクレオチドが効率よく移行したことを示している。

### 比較例 3

実施例5と同一の方法で、アンチセンスDNA（配列番号6）とリポフェクチン（ギブコ社製）との複合体のTNF- $\alpha$ 産生抑制効果を測定した。結果は図7に示したとおりであり、アンチセンス-リポフェクチンは、かなり高いアンチセンス濃度（50  $\mu$ M）であるにもかかわらず、TNF- $\alpha$ 産生抑制効果は20%程度であった。また、オリゴヌクレオチドの結合特異性にも差は見られなかった。さらに、図7には示していないが、実施例5と同一の方法により、S-アンチセンス（配列番号6）のTNF- $\alpha$ 産生抑制効果も測定した。その結果、このS-アンチセンスは、10  $\mu$ M濃度でもTNF- $\alpha$ 産生抑制効果は20%程度であった。

### 実施例 6

#### <COX-2に対するアンチセンス薬物の作成>

配列番号11のアンチセンス・オリゴヌクレオチドを用いたことを除き、実施例2と同様の方法でCOX-2に対するアンチセンス-PLSPを作成した。

このアンチセンス薬物について、実施例2と同様に濁りおよび沈殿物形成、オ

リボヌクレオチド濃度、その電荷等を測定した。

#### 実施例 7

<培養細胞に対する抗炎症性アンチセンス薬物の効果>

実施例 6 で作成したアンチセンス-PLSP の COX-2 産生抑制効果をヒト骨細胞の培養系において検討した。

ヒト骨細胞には、リウマチ患者の膝関節より切除した組織より調製したヒト滑膜細胞を使用し、その培養は、実施例 3 の U937 細胞と同一の条件で行い、細胞数をカウントした。

測定に際しては、 $2.8 \times 10^4$  個/ml に調製したヒト滑膜細胞を含む 0.3 ml の培地を 96 穴のマイクロプレート（ファルコン社製）に添加し、24 時間培養した。その後、上清を静かに取り除き、300  $\mu$ l の RPMI 培地で付着した細胞を洗浄し、以下の試験に供した。

各ウェルに、アンチセンス DNA 鎖単独と、実施例 6 で作成したアンチセンス-PLSP の溶液 0.15 ml を添加し、30 分後に 1 ng/ml の IL-1 $\beta$ （ジーンザイム、Lot. B41399）を必要に応じて添加した。アンチセンス DNA 鎖およびアンチセンス-PLSP は 1 nM から 10  $\mu$ M（最終濃度）の数種類を準備した。2 時間のインキュベーションの後、上清の 300  $\mu$ l を集め、必要に応じて希釈した後、PGE<sub>2</sub> エライザキット（日本パーセプティブリミテッド、No. 8-6801）で測定した。

また、対照として、比較例 1 の S-アンチセンスおよびジーントランスファー（和光純薬社製：Code 074-03621）とアンチセンス DNA 鎖との複合体（以下、アンチセンス-ジーントランスファーと略記する）についても同様に測定した。ジーントランスファーは、リボソーム系のキャリアーであり、従来よりオリゴヌクレオチド・キャリアーとして高く評価されている。

結果は図 8 に示したとおりであり、S-アンチセンスは PGE<sub>2</sub> の産生を全く抑制しなかった。同様に、アンチセンス-ジーントランスファーの場合も、PGE<sub>2</sub> の産生抑制は全く観察されなかった。

一方、この発明の抗炎症性アンチセンス薬物であるアンチセンス-PLSP は、 $\mu$ M オーダで PGE<sub>2</sub> の産生を効果的に抑制した。すなわち、92%（IL-1

$\beta$  添加時) の P G E<sub>2</sub> 産生が抑制された。

なお、注目すべきこととして、試験した濃度範囲内で P G E<sub>2</sub> 産生阻害におけるアンチセンス鎖とセンス鎖における結合特異性が顕著に現われた。

## 実施例 8

### <培養細胞への抗炎症性アンチセンス薬物の取り込み>

実施例 6 と同様にして作成したアンチセンス- P L S P の培養細胞への取り込み効率を試験した。

まず、アンチセンス DNA 鎖を以下の方法で標識した。DNA (1.83 OD<sub>260</sub> ユニット、5 pmol) 27.3  $\mu$ l、オートクレーブした蒸留水 15.7  $\mu$ l、10 $\times$ キナーゼ緩衝液 (250 mM トリス塩酸緩衝液: pH 7.6)、100 mM DTT、T4 ポリヌクレアーゼ溶液 (100 ユニット/ $\mu$ l)、 $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP 1  $\mu$ l を混合の後、37 $^{\circ}$ C にて 1 時間反応させた。なお、<sup>32</sup>P による標識には、T4 ポリヌクレオチドキナーゼキット (宝酒造製 Code No. 2030) を用いた。

培養細胞には実施例 2 と同様のヒトマクロファージ系 U937 細胞と、実施例 7 と同様のヒト滑膜細胞を使用した。実施例 7 と同様の条件で、 $1 \times 10^6$  個/ml の U937 細胞をガラスチューブ (ファルコン社製 2058、6 ml - 12  $\times$  75) にて培養した。ヒト滑膜細胞の場合には、目的の濃度に調製したアンチセンス- P L S P 溶液の 50  $\mu$ l を加えて培養し、U937 細胞の場合には 1 ng/ml の 12-o-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA: 和光純薬工業社製) を添加の後、アンチセンス- P L S P (最終濃度: 1 ng/ml から 10  $\mu$ g/ml) を添加して培養を続けた。所定の時間培養した後、培養チューブを 25 $^{\circ}$ C にて 10 分間、1500 rpm で遠心して細胞を沈殿させた後、上清を静かに取り除いた。次いで、チューブの底に付着した細胞に対して実施例 7 で使用したのと同様の P B S 溶液 3 ml を加えて 2 回の洗浄を行った後、1% の SDS (ドデシル硫酸ナトリウム) 500  $\mu$ l を加えて細胞を溶解した。最終的に、溶解液の全てに対して 10 ml のハイパーフロー溶液を加えて液体シンチレーターにて測定した。

また、対照として、実施例 7 と同様に S-アンチセンスおよびアンチセンス-ジーントランスファーについても同様に測定した。

結果は図 9 および図 10 に示したとおりであり、S-アンチセンスおよびアンチセンス-ジーントランスファーの場合には、U 9 3 7 細胞 (図 9) でもヒト滑膜細胞 (図 10) でもアンチセンス DNA は全く細胞内には取り込まれなかった。

一方、この発明のアンチセンス-PLSP は経時的に細胞内に取り込まれることが確認された。すなわち、3 時間までの培養では、S-アンチセンスと比較して 100 倍以上、またアンチセンス-ジーントランスファーと比較した場合には 50 倍以上の DNA が細胞内に取り込まれた。

#### 実施例 9

<エンドトキシン誘発ショックモデルマウスに対する抗炎症性アンチセンス薬物の致死抑制効果>

配列番号 13、14 および 15 のオリゴヌクレオチドを用いたことを除き、実施例 2 と同様の方法でマウス IL-1 $\beta$  に対するアンチセンス-PLSP、およびマウス TNF- $\alpha$  に対するアンチセンス-PLSP を作成し、そのエンドトキシン誘発ショックに対する致死抑制効果をモデルマウスを用いて検討した。

生理食塩水によって目的の濃度に調製したアンチセンス-PLSP 溶液 200  $\mu$ l を、8~10 週齢の BALB/c 雄マウス (日本 SLC 社: 約 20 g) へ尾静脈内投与した。その直後、20 mg/kg 相当に生理食塩水で調製したエンドトキシン (LPS、Lot No. 68692 W.E. coli055:B5. Difco 社製) 溶液 200  $\mu$ l をマウス腹腔内へ投与して、経時的に生存固体数を計測した。

結果は図 11~図 14 に示したとおりである。先ず、図 11 に示したとおり、IL-1 $\beta$  に対するアンチセンス-PLSP を用いた場合には、投与したアンチセンス薬物の濃度に依存してマウスの生存率は上昇した。特に、100 mg/kg 濃度のアンチセンス-PLSP を投与した場合には、40 時間にわたり死亡例は認められなかった。

また、図 12 に示したとおり、10 mg/kg 濃度のアンチセンス-PLSP を一度に投与した場合と、5 mg/kg 濃度のアンチセンス-PLSP を二度に

分けて投与した場合（合計  $10 \text{ mg/kg}$ ）の効果を比較したところ、この発明のアンチセンス薬物を  $12$  時間間隔で二度に分けて投与するほうが、単回投与に比べ効果的であることが判明した。

図 13 は、アンチセンス-PLSP を尾静脈内投与した場合と、腹腔内投与した場合の効果の差を示したものである。アンチセンス-PLSP は腹腔内投与した場合には致死抑制効果を示さなかったが、尾静脈内投与では優れた致死抑制効果を示したことから、この発明のアンチセンス薬物は投与経路により効果に差を生じさせるものであることが認められた。

さらに、図 14 に示したとおり、 $IL-1\beta$  に対するアンチセンス薬物と  $TNF-\alpha$  に対するアンチセンス薬物の効果を比較したところ、 $30 \text{ mg/kg}$  濃度で投与した場合には、 $TNF-\alpha$  に対するアンチセンス薬物のほうが致死抑制効果が高く、 $40$  時間後のマウス生存率は  $60\%$  であった。

以上のモデルマウスを用いた試験結果から、この発明のアンチセンス薬物は *in vivo* モデル実験系においても優れた薬効を示すことが確認された。

#### 産業上の利用可能性

この発明により、一次構造特異的にセンス RNA へ結合し、しかも非常に低い濃度領域で十分な生理活性物質抑制効果を発揮する抗炎症性アンチセンス薬物が提供される。これによって、慢性関節リウマチ、歯周囲炎、腎炎、潰瘍性大腸炎、動脈硬化症、乾癬などの炎症性疾患、敗血症性ショック、クローン病、エイズ等の疾患、または難治性肝疾患や肝移植による病態に対する有効な治療が可能となる。

## 配列表

配列番号 : 1

配列の長さ : 20

配列の型 : 核酸

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列の特徴

ヒト IL-1 $\beta$  遺伝子のイニシエーションコドンを含む

配列

GCAGCCATGG CAGAAGTACC

20

配列番号 : 2

配列の長さ : 20

配列の型 : 核酸

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列の特徴

配列番号 1 のアンチセンス鎖

配列

GGTACTTCTG CCATGGCTGC

20

配列番号 : 3

配列の長さ : 20

配列の型 : 核酸

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列の特徴

ヒト IL-1 $\beta$  遺伝子の非翻訳領域を含む

配列

AGAGAGCTGT ACCCAGAGAG

20

配列番号 : 4

配列の長さ : 20

配列の型 : 核酸

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列の特徴

配列番号3のアンチセンス鎖

配列

CTCTCTGGGT ACAGCTCTCT

20

配列番号 : 5

配列の長さ : 20

配列の型 : 核酸

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列の特徴

ヒトTNF- $\alpha$ 遺伝子のイニシエーションコドンを含む

配列

CCCTGGAAAG GACACCATGA

20

配列番号 : 6

配列の長さ : 20

配列の型 : 核酸

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列の特徴

配列番号5のアンチセンス鎖

配列

TCATGGTGTC CTTTCCACGG

20

配列番号 : 7

配列の長さ : 20

配列の型 : 核酸



配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の特徴

ヒトTNF- $\alpha$ 遺伝子のスプライシングサイト（1624-1643番目）を含む

配列

CCAGGCAGTC AGTAAGTGTC

20

配列番号：8

配列の長さ：20

配列の型：核酸

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の特徴

配列番号7のアンチセンス鎖

配列

GACACTTACT GACTGCCTGG

20

配列番号：9

配列の長さ：20

配列の型：核酸

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の特徴

ヒトTNF- $\alpha$ 遺伝子のスプライシングサイト（2161-2180番目）を含む

配列

CTCCCTCCAG CAAACCCTCA

20

配列番号：10

配列の長さ：20

配列の型：核酸

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の特徴

## 配列番号 9 のアンチセンス鎖

## 配列

TGAGGGTTTG CTGGAGGGAG

20

配列番号 : 1 1

配列の長さ : 2 0

配列の型 : 核酸

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

## 配列の特徴

ヒトCOX-2遺伝子のイニシエーションコドンを含む

## 配列

TGCCCGCCGC TGCGATGGCTC

20

配列番号 : 1 2

配列の長さ : 2 0

配列の型 : 核酸

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

## 配列の特徴

配列番号11のアンチセンス鎖

## 配列

GAGCATCGCA GCGGCGGGCA

20

配列番号 : 1 3

配列の長さ : 2 0

配列の型 : 核酸

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

## 配列の特徴

マウスIL-1 $\beta$ 遺伝子のイニシエーションコドンを含む

## 配列

GCAGCTATGG CAACTGTTCC

20

配列番号 : 14

配列の長さ : 20

配列の型 : 核酸

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列の特徴

配列番号13のアンチセンス鎖

配列

GGAACAGTTG CCATAGCTGC

20

配列番号 : 15

配列の長さ : 20

配列の型 : 核酸

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列の特徴

マウスTNF- $\alpha$ 遺伝子のイニシエーションコドンを含む20塩基のアンチセンス鎖

配列

ATCATGCTTT CTGTGCTCAT

20

## 請求の範囲

1 合成ポリアミノ酸またはその誘導体と、ヒト炎症性疾患に關与する生理活性物質をコードするmRNAの一部もしくは全塩基配列に相補的なアンチセンス・オリゴヌクレオチドとの複合体からなることを特徴とする抗炎症性アンチセンス薬物。

2 合成ポリアミノ酸が、リジン残基とセリン残基との繰返し配列からなる核酸結合体または核酸誘導体である請求項1の抗炎症性アンチセンス薬物。

3 合成ポリアミノ酸の誘導体が、合成ポリアミノ酸のポリエチレングリコールブロック修飾体である請求項2の抗炎症性アンチセンス薬物。

4 ヒト炎症性疾患に關与する生理活性物質が、ヒト慢性関節リウマチに關与する生理活性物質である請求項1の抗炎症性アンチセンス薬物。

5 合成ポリアミノ酸またはその誘導体と、ヒトインターロイキン-1 $\beta$ をコードするmRNAの一部もしくは全塩基配列に相補的なアンチセンス・オリゴヌクレオチドとの複合体からなることを特徴とする請求項1の抗炎症性アンチセンス薬物。

6 ヒトインターロイキン-1 $\beta$ をコードするmRNAの一部もしくは全塩基配列に相補的なアンチセンス・オリゴヌクレオチドが、配列番号2または4の一部もしくは全塩基配列を有するオリゴヌクレオチドである請求項5の抗炎症性アンチセンス薬物。

7 合成ポリアミノ酸またはその誘導体と、ヒト腫瘍壊死因子をコードするmRNAの一部もしくは全塩基配列に相補的なアンチセンス・オリゴヌクレオチドとの複合体からなることを特徴とする請求項1の抗炎症性アンチセンス薬物。

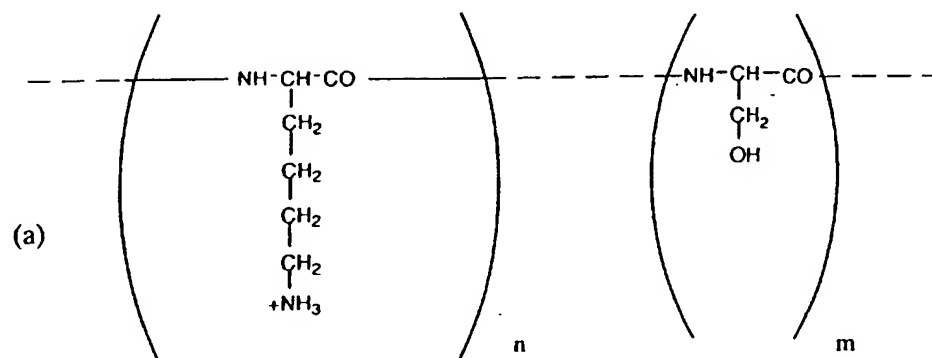
8 ヒト腫瘍壊死因子が、ヒト腫瘍壊死因子- $\alpha$ である請求項7の抗炎症性アンチセンス薬物。

9 ヒト腫瘍壊死因子- $\alpha$ をコードするmRNAの一部もしくは全塩基配列に相補的なアンチセンス・オリゴヌクレオチドが、配列番号6、配列番号8または配列番号10のいずれかの一部もしくは全塩基配列を有するオリゴヌクレオチドである請求項8の抗炎症性アンチセンス薬物。

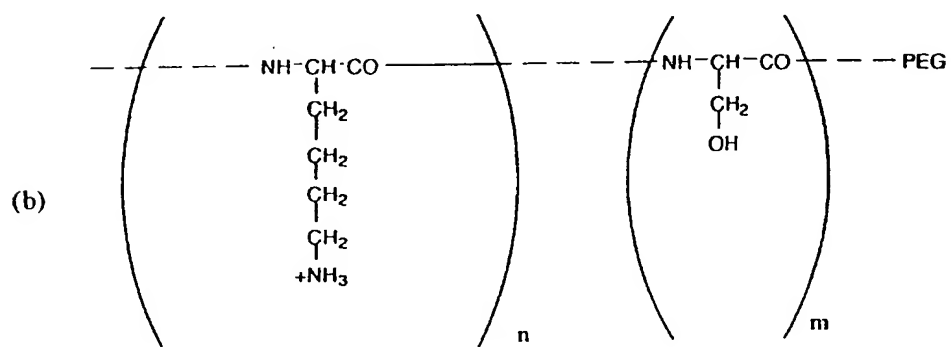
10 合成ポリアミノ酸またはその誘導体と、一連のプロスタグランジン E<sub>2</sub> 合成酵素をコードする mRNA の一部もしくは全塩基配列に相補的なアンチセンス・オリゴヌクレオチドとの複合体からなることを特徴とする請求項 1 の抗炎症性アンチセンス薬物。

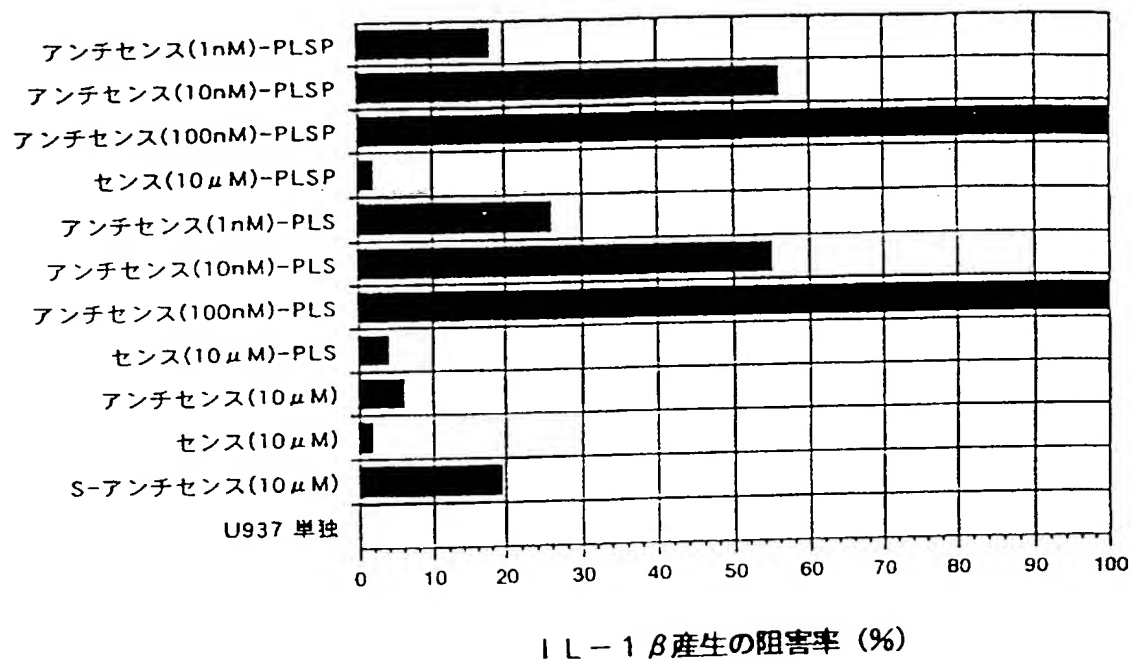
11 プロスタグランジン E<sub>2</sub> 合成酵素が、シクロオキシゲナーゼ 2 である請求項 10 の抗炎症性アンチセンス薬物。

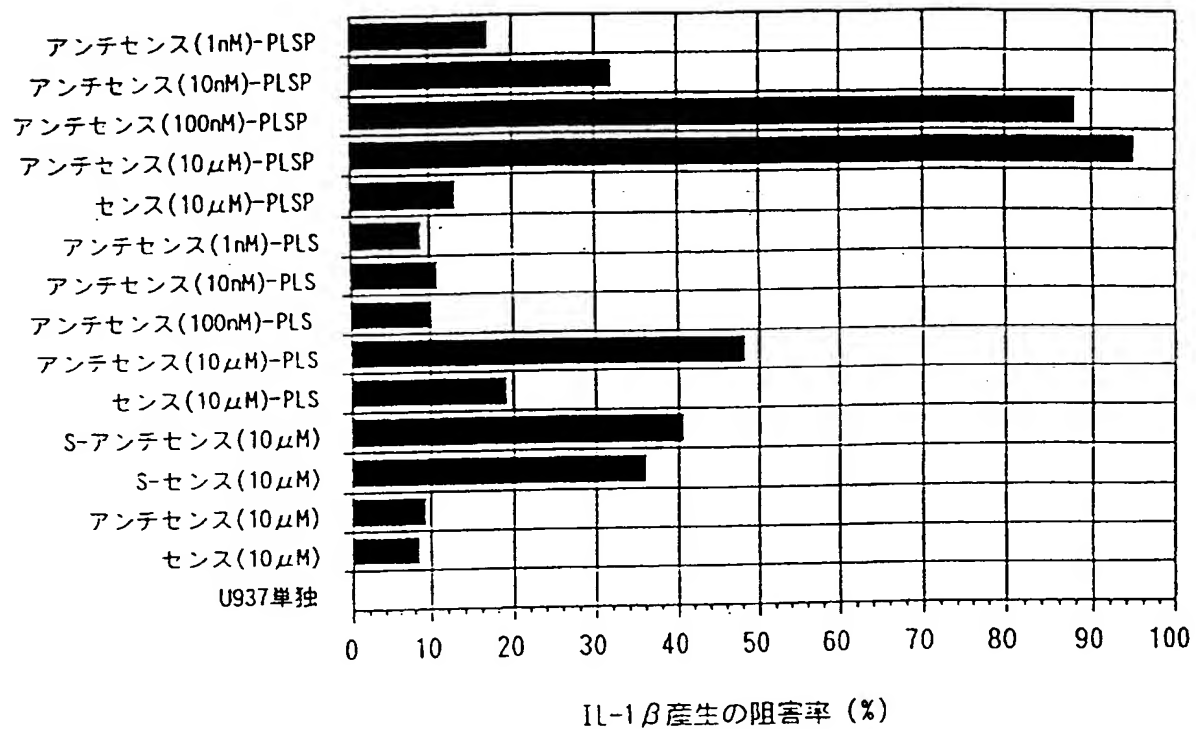
12 シクロオキシゲナーゼ 2 をコードする mRNA の一部もしくは全塩基配列に相補的なアンチセンス・オリゴヌクレオチドが、配列番号 12 の一部もしくは全塩基配列を有するオリゴヌクレオチドである請求項 11 の抗炎症性アンチセンス薬物。



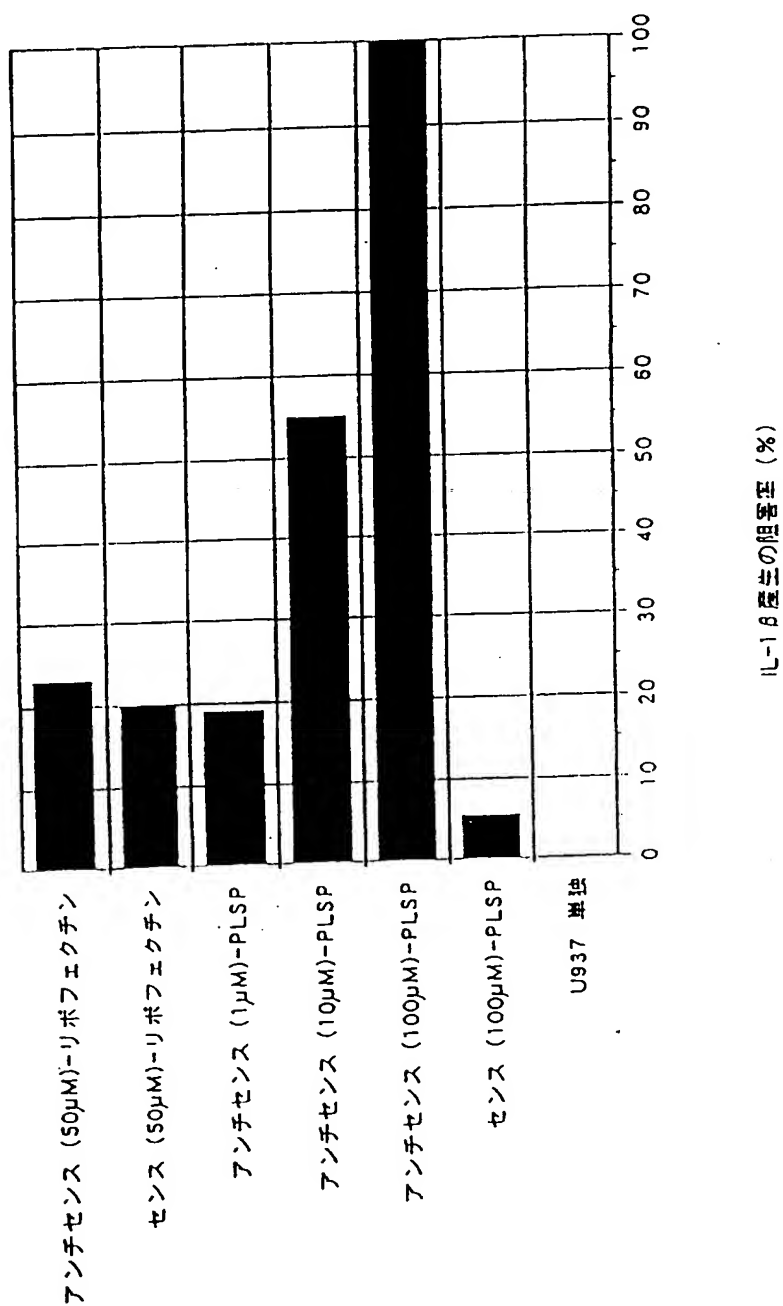
ポリ-リジン：セリン コポリマー (PLS)

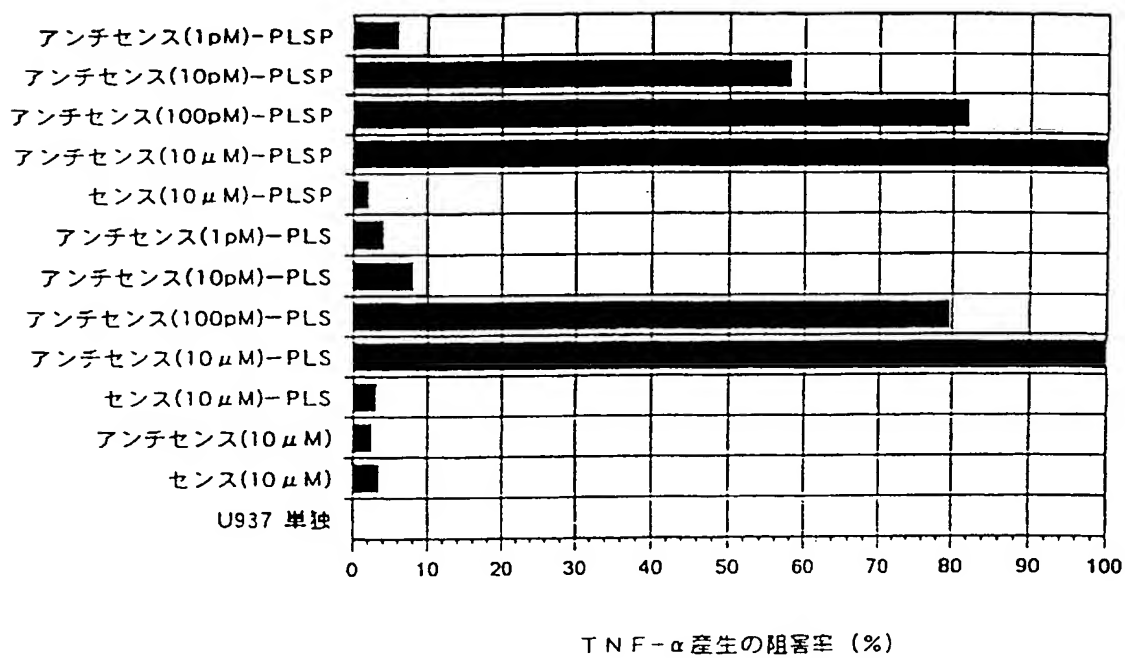
ポリ-リジン：セリンコポリマーのポリエチレングリコール結合体 (PLSP)  
(PEGの分子量は5000)

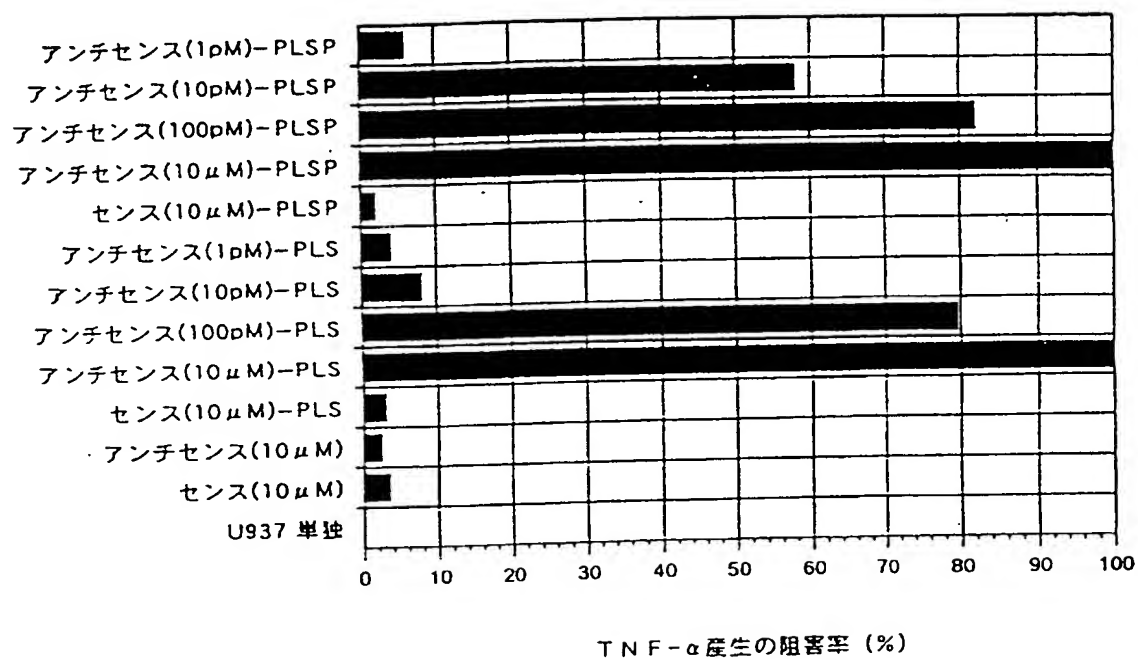


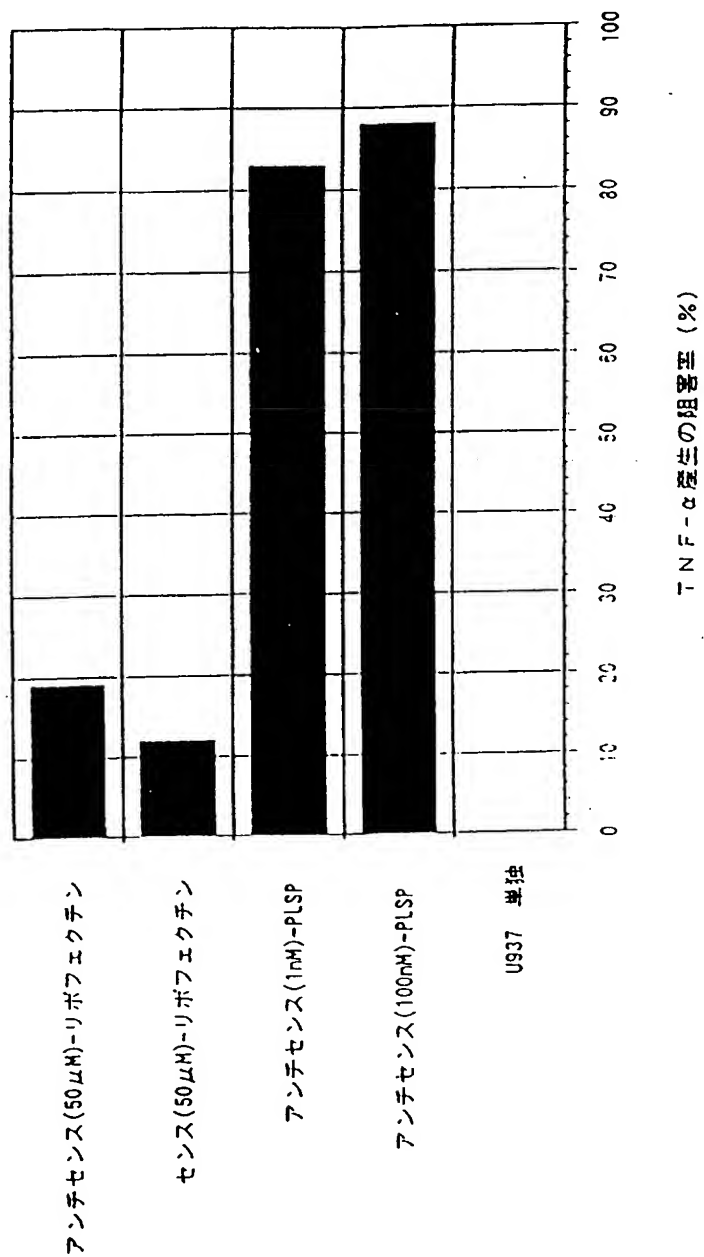


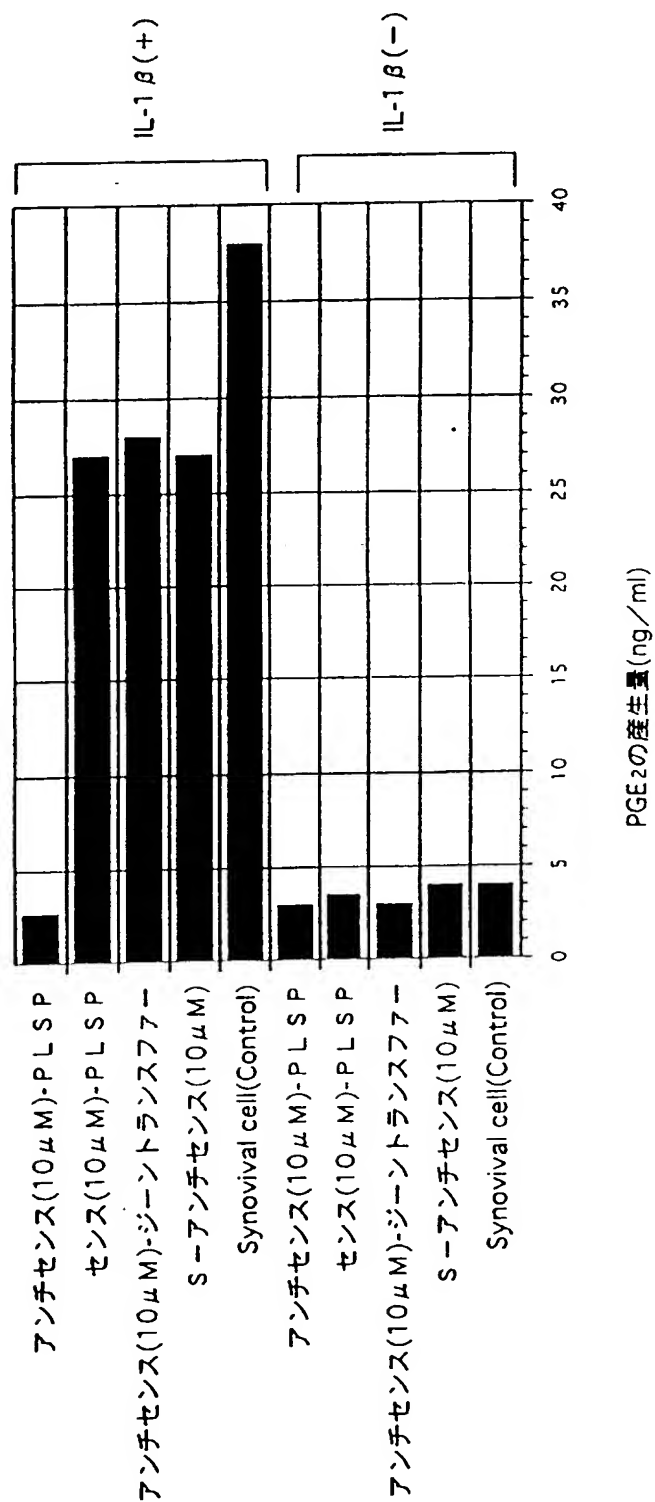


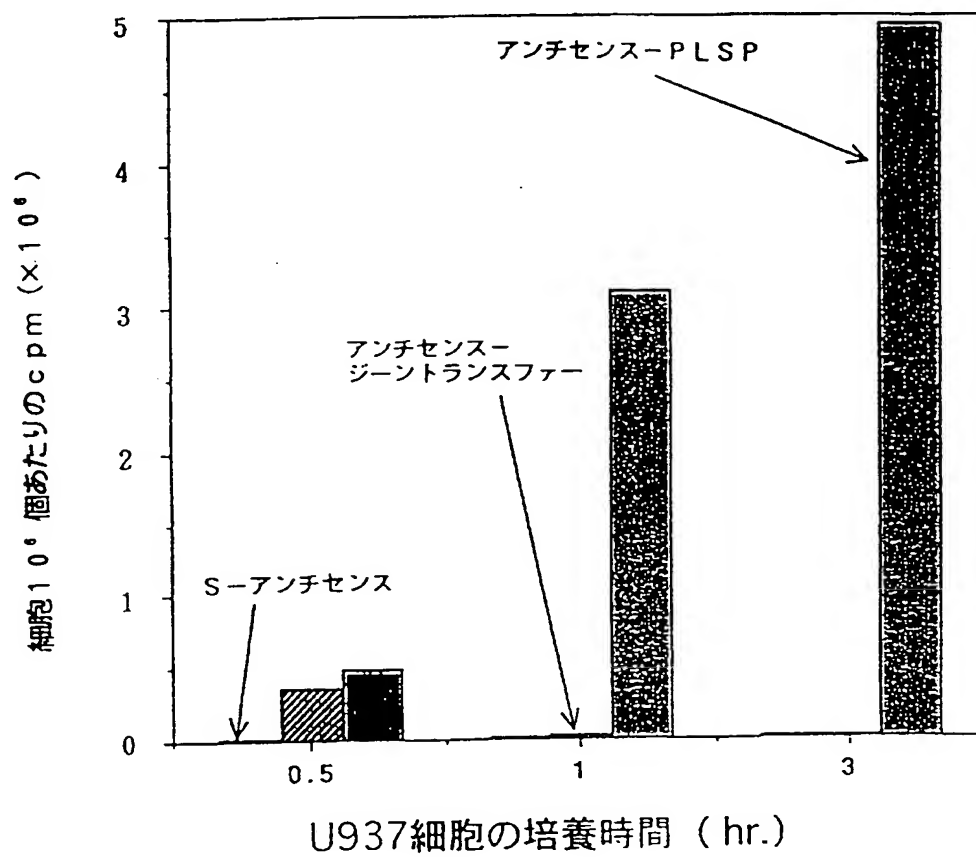


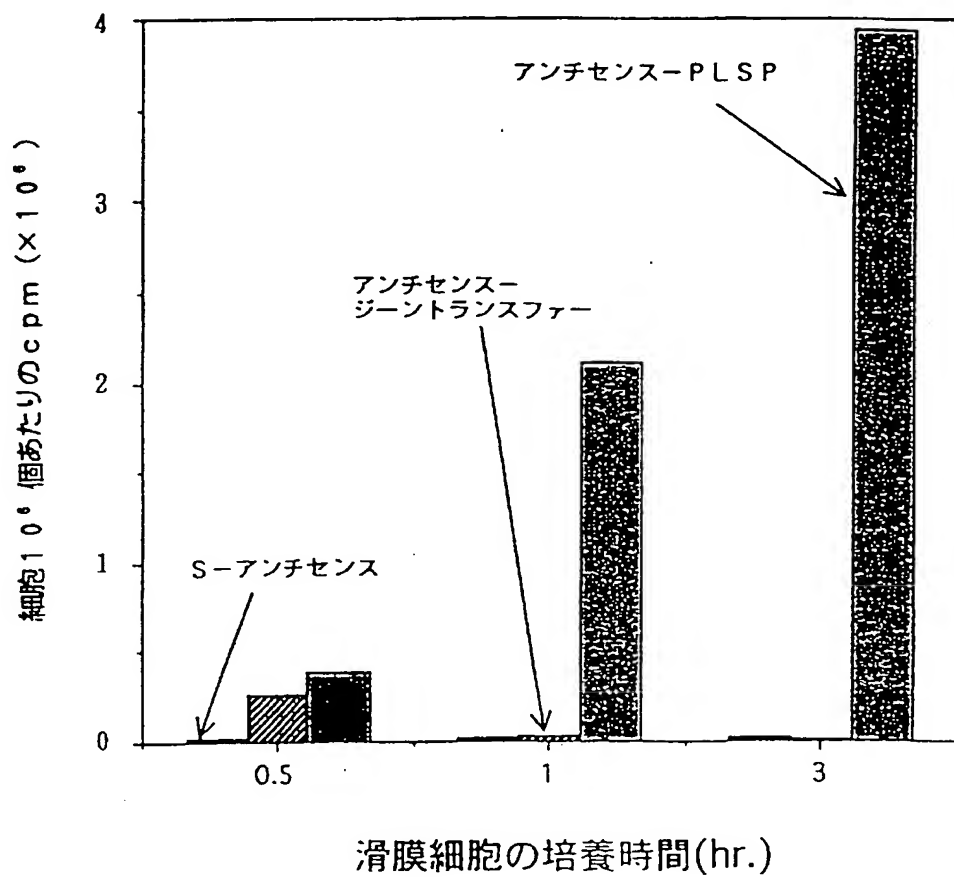


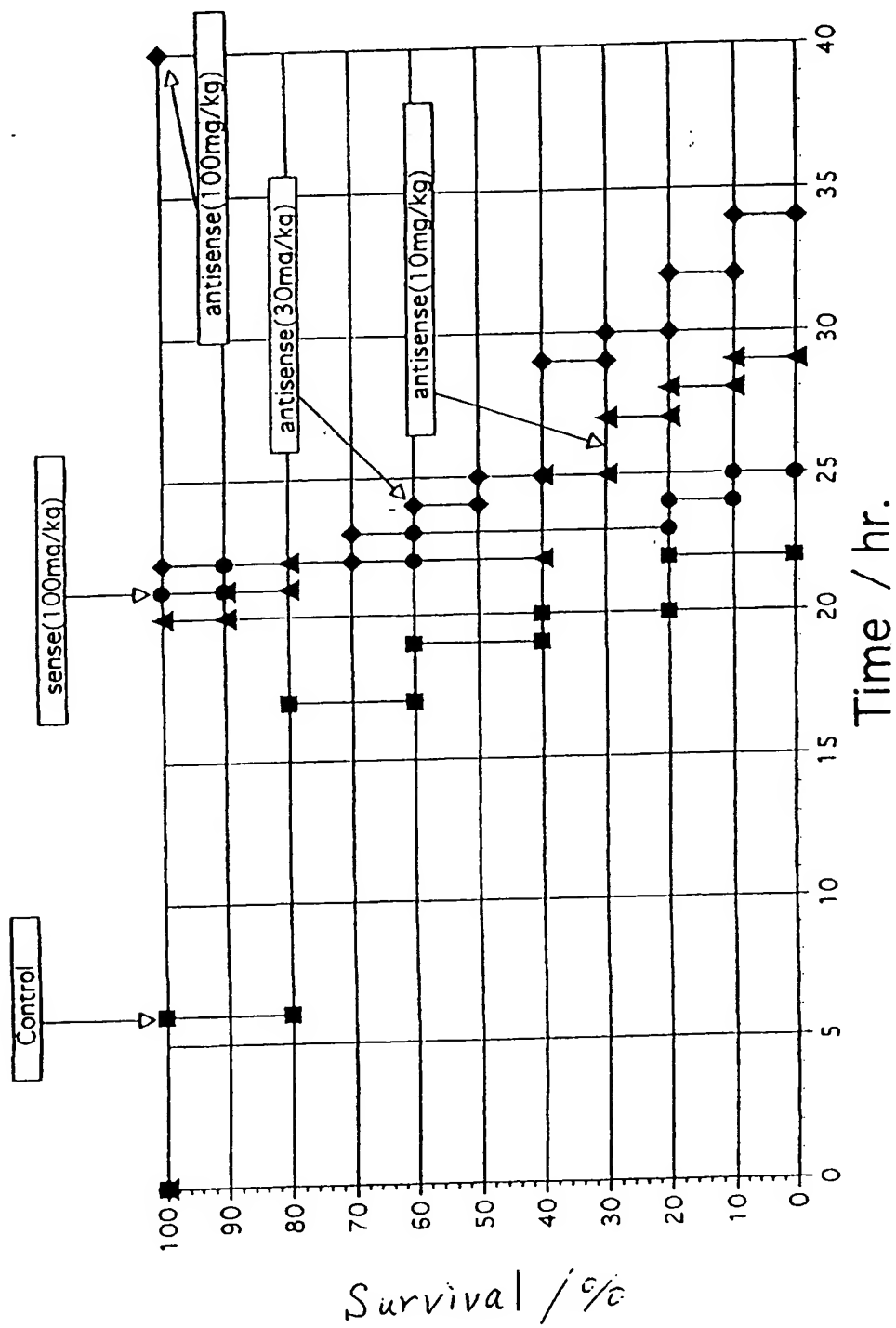




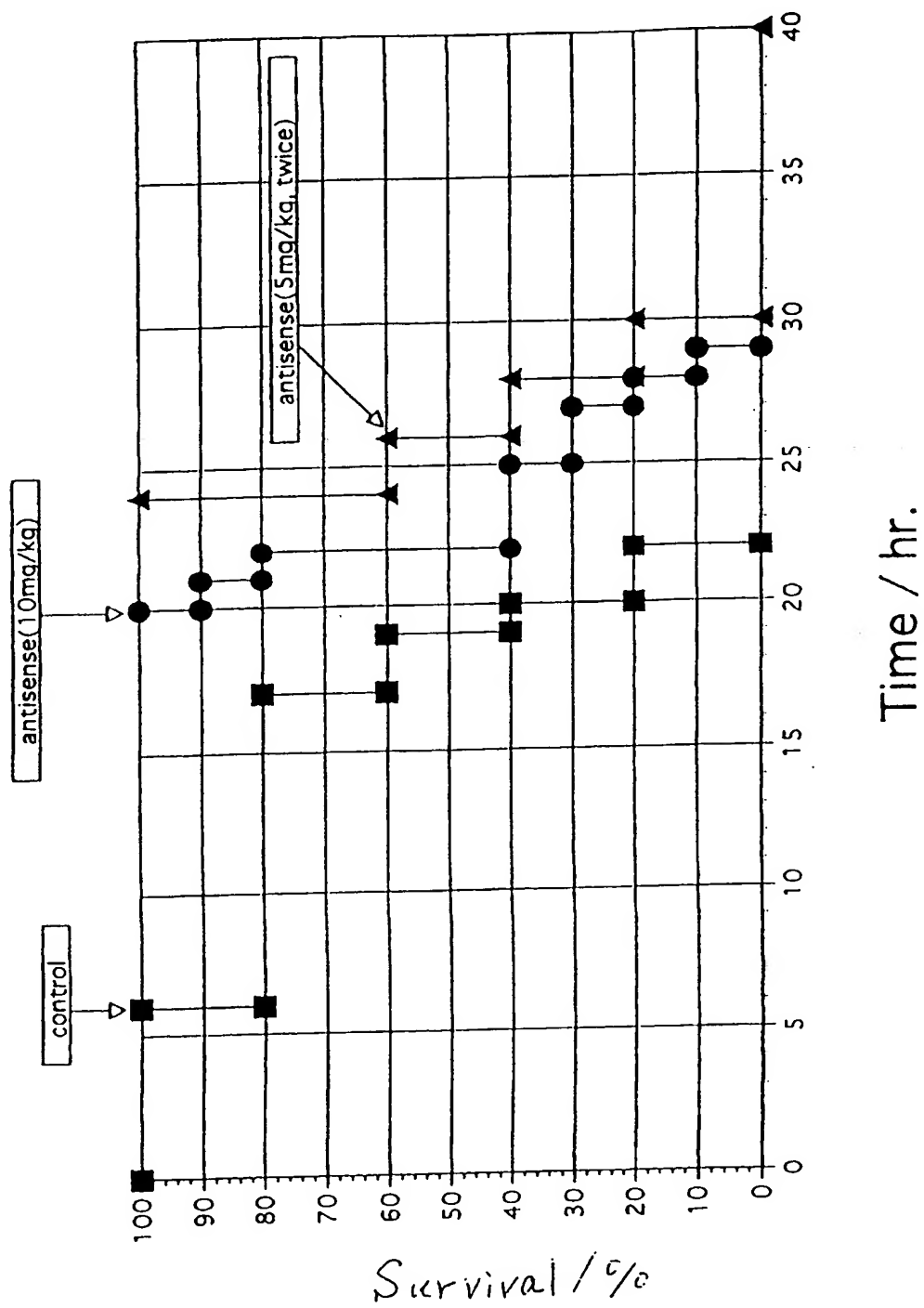


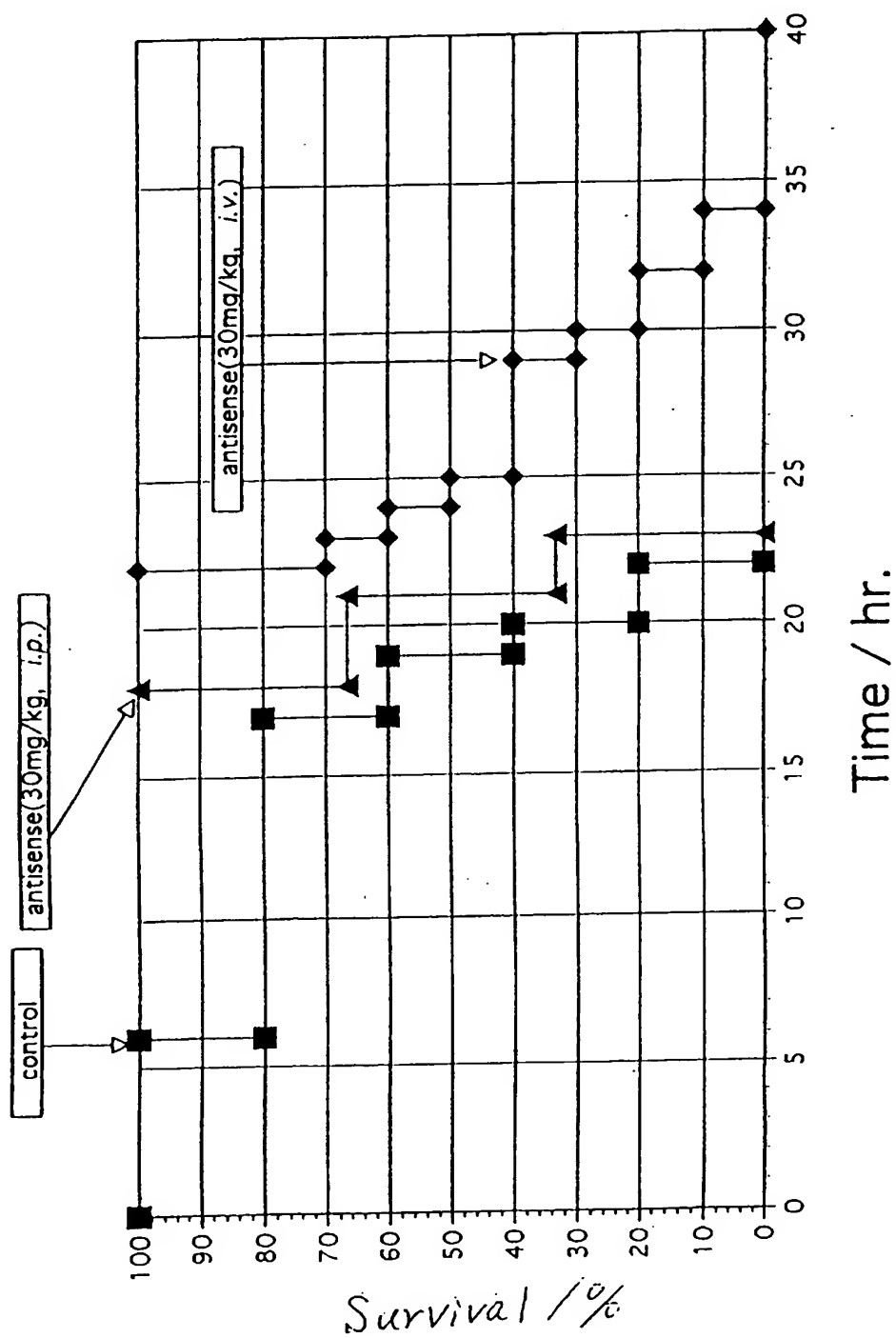


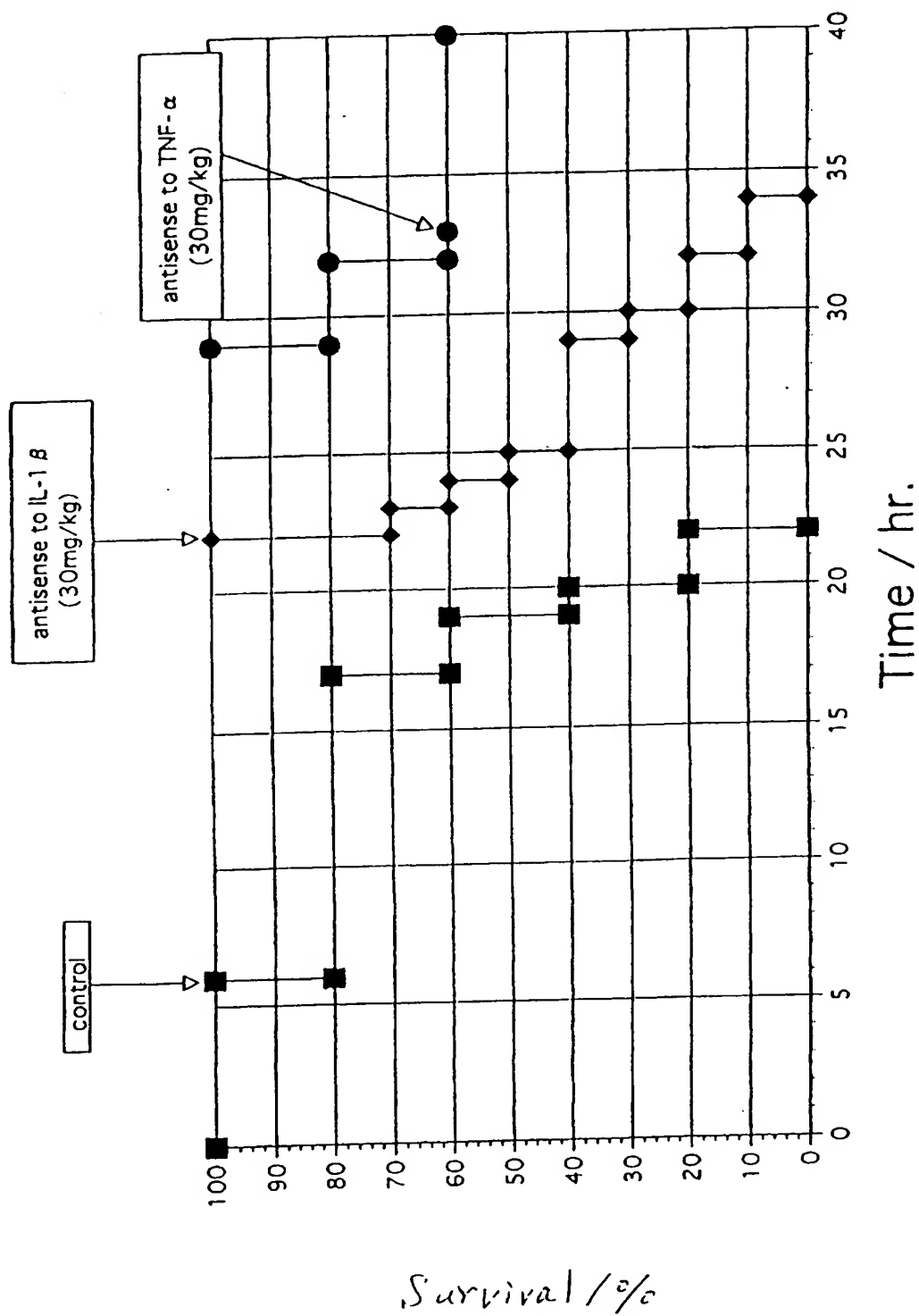












# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/02682

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. C1<sup>6</sup> A61K38/14, A61K48/00, A61K31/70

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. C1<sup>6</sup> A61K38/14, A61K48/00, A61K31/70

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS ONLINE (ANTISENSE, INTERLEUKIN, TUMOR NECROSIS FACTOR CYCLOOXYGENASE ETC.), WPI/L ON DIALOG

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	"Interaction between charged peptides and nucleic acids : development of a histone- or peptide-mediated potential drug delivery system", Nucleic Acids Symposium Series, No. 31 (1994) P. 227-228	1, 2, 4-8 3, 9, 12
Y A	JP, 6-41185, A (K.K. LTT), February 15, 1994 (15. 02. 94) (Family: none)	1, 2, 4-6 3
A	WO, 94/4196, A (Imperial Cancer Res. Technology), March 3, 1994 (03. 03. 94) (Family: none)	9
A	"Cloning and expression in Escherichia coli of the gene for human tumor necrosis factor", Nature, Vol. 313, No. 6005 (1985) P. 803-806	9
Y	DE, 4341471, A (Schering AG.), June 8, 1995 (08. 06. 95) (Family: none)	1, 2, 4, 7, 8
Y	WO, 95/15959, A (Schering Corp.), June 15, 1995 (15. 06. 95)	1, 2, 4, 7, 8

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date  
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

December 19, 1996 (19. 12. 96)

Date of mailing of the international search report

January 14, 1997 (14. 01. 97)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/02682

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	& EP, 733049, A	
Y	DE, 4342846, A (Schering AG.), June 14, 1995 (14. 06. 95) (Family: none)	1, 2, 4, 7, 8
Y A	WO, 94/13635, A (Merck Frosst Canada, Inc., Can.), June 23, 1994 (23. 06. 94) & EP, 673366, A & JP, 8-504408, A	1, 2, 4, 10 11
A	"Supression of monocyte 85-KDa phospholipase A2 by antisense and effects on endotoxin-induced prostaglandin biosynthesis" J. Biol. Chem., Vol. 269, No. 42 (1994) P. 25999-26005	11
Y A	US, 5436265, A (Merck Frosst Canada, Inc., Can.), January 25, 1995 (25. 01. 95) & GB, 2283745, A	1, 2, 4, 10 11

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>4</sup> A61K38/14, A61K48/00, A61K31/70

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>4</sup> A61K38/14, A61K48/00, A61K31/70

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS ONLINE (ANTISENSE, INTERLEUKIN, TUMOR NECROSIS FACTOR  
CYCLOOXYGENASE等)、WPI/L ON DIALOG

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	「Interaction between charged peptides and nucleic acids : development of a histone- or peptide-mediated potential drug delivery system」, Nucleic Acids Symposium Series, No. 31 (1994) P. 227-228	1, 2, 4-8
A		3, 9, 12
Y	JP, 6-41185, A (株式会社エルティーティー) 15. 2月. 1994 (15. 02. 94), ファミリーなし	1, 2, 4-6
A		3
A	WO, 94/4196, A (Imperial Cancer Res. Technology) 3. 3月. 1994, ファミリーなし	9

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

19. 12. 96

国際調査報告の発送日

14.01.97

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田村 聖子

印

4C

9051

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

## C (続き) . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	「Cloning and expression in Escherichia coli of the gene for human tumor necrosis factor」, Nature, Vol. 313, No. 6005 (1985) P. 803-806	9
Y	DE, 4341471, A (Schering AG.) 8. 6月. 1995 (08. 06. 95), ファミリーなし	1, 2, 4, 7, 8
Y	WO, 95/15959, A (Schering Corp.) 15. 6月. 1995 (15. 06. 95) & EP, 733049, A	1, 2, 4, 7, 8
Y	DE, 4342846, A (Schering AG.) 14. 6月. 1995 (14. 06. 95), ファミリーなし	1, 2, 4, 7, 8
Y A	WO, 94/13635, A (Merck Frosst Canada, Inc., Can.) 23. 6月. 1994 (23. 06. 94) & EP, 673366, A & JP, 8-504408, A	1, 2, 4, 10 11
A	「Suppression of monocyte 85-KDa phospholipase A2 by antisense and effects on endotoxin-induced prostaglandin biosynthesis」 J. Biol. Chem., Vol. 269, No. 42 (1994) P. 25999-26005	11
Y A	US, 5436265, A (Merck Frosst Canada, Inc., Can.) 25. 1月. 1995 (25. 01. 95) & GB, 2283745, A	1, 2, 4, 10 11

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKÉWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**